

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-504052

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成6年(1994)5月12日

(51) Int.Cl.⁸

C 0 7 C 215/40

A 6 1 K 31/13

識別記号

A B B

A B E

A C B

A D U

庁内整理番号

7457-4H

F I

9283-4C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-502850
 (86) (22) 出願日 平成3年(1991)12月23日
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)6月28日
 (86) 国際出願番号 PCT/US91/09196
 (87) 国際公開番号 WO92/12119
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)7月23日
 (31) 優先権主張番号 636, 353
 (32) 優先日 1990年12月31日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 724, 625
 (32) 優先日 1991年7月2日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ザ バイオメンブレン インスティテュー
 ト
 アメリカ合衆国 98119 ワシントン シ
 アトル エリオット アベニュー ウェスト
 201
 (72) 発明者 キムラ サトシ
 アメリカ合衆国 98119 ワシントン シ
 アトル エリオット アベニュー ウェスト
 201 ザ バイオメンブレン インステ
 イテュート内
 (74) 代理人 弁理士 三枝 英二 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテインキナーゼC活性；インビトロでのメラノーマ細胞増殖；インビボでの転移潜在力およ
 びヒト血小板凝集に対するN, N, N-トリメチルスフィンゴシンの効果

(57) 【要約】

本発明は、新規な化合物、組成物およびその薬剤に関し、ならびに該化合物、組成物または薬剤を使用することによって、細胞増殖、血小板凝集（種々の因子によって誘導される）を阻害し、転移特性を有するような腫瘍細胞の悪性表現型を阻害し、および細胞接着分子の発現および機能を調整する方法に、関する。N, N, N-トリメチルスフィンゴシンは、関連する化合物よりも優れた、細胞増殖阻害および抗転移活性を示す。

請求の範囲：

1. N,N,N-トリメチルスフィンゴシン。
2. N,N,N-トリメチルスフィンゴシンの薬学的に許容できる塩。
3. (a) 細胞増殖を阻害する量のN,N,N-トリメチルスフィンゴシンまたは薬学的に許容できるその塩；および
(b) 薬学的に許容できる担体、希釈液または賦形剤を含有する薬剤。
4. (a) 細胞増殖を阻害する量のN,N,N-トリメチルスフィンゴシン；および
(b) 担体、希釈液またはバッファーを含有する組成物。
5. 細胞増殖を阻害する方法であって、細胞に細胞増殖を阻害する量のN,N,N-トリメチルスフィンゴシンを接触させることを包含する方法。
6. 前記接触工程がインビトロで行われる請求項5に記載の方法。
7. 前記接触工程がインビボで行われる請求項5に記載の方法。
8. 前記細胞が癌細胞である請求項5に記載の方法。
9. 前記細胞が免疫系のものである請求項5に記載の方法。

N-トリメチルスフィンゴシンを生成する工程；および

(f) そこから生成される該ハロゲン誘導体化N,N,N-トリメチルスフィンゴシンを分離する工程をさらに包含する請求項10に記載のN,N,N-トリメチルスフィンゴシン。

15. N,N,N-トリメチルスフィンゴシンを合成する方法であって、

- (a) N,N-ジメチルスフィンゴシンをヨードメタンで処理して沈殿物を生成させる工程；および
- (b) 該沈殿物をクロロホルムで抽出する工程を包含する方法。

16. 前記N,N-ジメチルスフィンゴシンが

- (a) スフィンゲニンをホルムアルデヒドで処理する工程；
- (b) 該処理されたスフィンゲニンを水酸化ホウ素ナトリウムおよび過剰のメタノールに曝してN,N-ジメチルスフィンゴシンを生成させる工程；および
- (c) 該N,N-ジメチルスフィンゴシンをクロロホルムで抽出する工程

を包含する過程によって合成される請求項15に記載の方法。

法。

10. (a) 無水有機溶媒中に(4E)-N,N-ジメチル-D-エリスロ-スフィンゴシンを溶解して溶液を生成する工程；
(b) 新しく蒸留したヨードメタンを工程(a)の該溶液中に溶解して混合物を生成する工程；
(c) 工程(b)の該混合物をインキュベートしてN,N,N-トリメチルスフィンゴシン産物を生成する工程；および
(d) そこから生成される該N,N,N-トリメチルスフィンゴシンを分離する工程を包含する過程によって作製されるN,N,N-トリメチルスフィンゴシン。

11. 前記有機溶媒が無水クロロホルムである請求項10に記載のN,N,N-トリメチルスフィンゴシン。

12. 前記ヨードメタンが25-100%過剰に存在する請求項10に記載のN,N,N-トリメチルスフィンゴシン。

13. 工程(c)の前記混合物が一晩インキュベートされる請求項10に記載のN,N,N-トリメチルスフィンゴシン。

14. 前記過程が

- (a) 工程(d)の前記生成物を中性化された陰イオン交換樹脂とともに攪拌してハロゲン誘導体化N,N,N-

17. 血小板凝集を阻害する方法であって、凝集阻害量のN,N,N-トリメチルスフィンゴシンに血小板を曝すことを包含する方法。

18. 前記血小板凝集が癌細胞によって誘導される請求項17に記載の方法。

19. (a) 血小板凝集阻害量のN,N,N-トリメチルスフィンゴシンまたは薬学的に許容できるその塩；および

- (b) 薬学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤を含有する薬剤。

20. (a) 血小板凝集阻害量のN,N,N-トリメチルスフィンゴシン；および

- (b) 担体、希釈剤またはバッファーを含有する組成物。

21. 治療を必要としている宿主に細胞増殖阻害量のN,N,N-トリメチルスフィンゴシンまたは薬学的に許容できるその塩を投与することを包含する治療方法。

22. 治療を必要としている宿主に血小板凝集阻害量のN,N,N-トリメチルスフィンゴシンまたは薬学的に許容できるその塩を投与することを包含する治療方法。

23. 細胞間接触を調整する方法であって、生物学的有効量のN,N-ジメチルスフィンゴシンまたはN,N,N-トリメチ-

ルスフィンゴシンに細胞を曝すことを包含し、該生物学的有効量は細胞接着分子の発現または機能を阻害する量である方法。

24. 前記細胞が免疫系細胞、内皮細胞、腫瘍細胞および血小板からなる群から選択される請求項23に記載の方法。

25. 前記接着分子がセレクトリン(selectin)である請求項23に記載の方法。

26. 前記セレクトリン(selectin)がELAMまたはGMP-140である請求項25に記載の方法。

27. N,N-ジメチルスフィンゴシンを含有する請求項23に記載の方法。

28. N,N,N-トリメチルスフィンゴシンを含有する請求項23に記載の方法。

29. 炎症反応を調整するための治療方法であって、治療を必要としている宿主に好中球活性を阻害できる量のN,N,N-トリメチルスフィンゴシンまたは薬学的に許容できるその塩を投与することを包含する方法。

30. 前記量が好中球の質内皮移動を阻害できる請求項29に記載の方法。

31. 前記量が好中球のスーパーオキシド産生を阻害できる請求項29に記載の方法。

明細書

プロテインキナーゼC活性；インビトロでのメラノーマ細胞増殖；インビボでの転移潜在力およびヒト血小板凝集に対するN,N,N-トリメチルスフィンゴシンの効果

本明細書に開示されている研究の構成部分は、国立癌研究所(National Cancer Institute)によって一部、支持される。

この出願は、1990年12月31日に出版された同時係属中の米国特許出願第07/636,353号の出願の一部継続出願である、1991年7月2日に出版された同時係属中の米国特許出願第07/724,625号の出願の一部継続出願である。

発明の分野

本発明は、プロテインキナーゼC活性および哺乳動物細胞の増殖に対して強い効果を有する化合物に関し；および該化合物の使用方法に関する。

発明の背景

スフィンゴシン(SPH)は、細胞膜で見い出され、化学式 $C_{18}H_{37}O_2N$ である長鎖の不飽和アミノアルコールであり、神経組織では高い濃度で存在する。スフィンゴシンおよびスフィンゴイド塩基(末端に1,3-デヒドロキシ-2-アミノ基を含有する長鎖の脂肪族塩基、およびその誘導体)

32. スーパーオキシドに曝されることから生じる組織損傷を最小化するための治療方法であって、治療を必要としている宿主に好中球のスーパーオキシド産生を阻害できる量のN,N,N-トリメチルスフィンゴシンまたは薬学的に許容できるその塩を投与することを包含する方法。

33. 好中球の代謝をコントロールする方法であって、活性を阻害する量のN,N,N-トリメチルスフィンゴシンに好中球を曝すことを包含する方法。

34. 前記量が好中球のスーパーオキシド産生を阻害する請求項33に記載の方法。

35. 前記量が好中球の移動を阻害する請求項33に記載の方法。

36. 生物学的物質を貯蔵するための方法であって、細胞増殖阻害量のN,N,N-トリメチルスフィンゴシンに該物質を曝すことを包含する方法。

37. 前記生物学的物質が血液または血液産物である請求項36に記載の方法。

は、プロテインキナーゼC(PK-C)およびEGF レセプター関連チロシンキナーゼ(EGF-RE)の阻害剤として関連があるとされてきた(Hannun & Bell, Science, 235, 670, 1987; Hannun, JBC, 261, 12604, 1986; Kreutter, JBC, 262, 1632, 1987)。

プロテインキナーゼC活性は、細胞の増殖に密接に関連し、最近の研究は、いくつかの実験的腫瘍において、腫瘍形成性の亢進がPK-C₁およびPK-C₂の過剰発現と相関することを示している(Houseyら, Cell, 53, 343, 1989; Personsら, Cell, 52, 447, 1988)。PK-C₂の産生体は、増大された転移潜在力(metastatic potential)を有する高度に悪性の腫瘍細胞を誘導する(Negishi & Sasurek, Nature, 324, 807, 1989)。PK-Cの異常な発現は、腫瘍増殖に関連し得ると思われる。

最近の研究は、リン脂質、スフィンゴ脂質およびそれらの代謝産物が、PK-Cおよび他の膜関連キナーゼ、例えばEGF レセプター関連チロシンキナーゼによる質膜信号伝達(transmembrane signaling)の調節に重要な役割を有することを示している(Hakowori, JBC, 265, 18713, 1990)。例えば、PK-C活性は、ジアシルグリセロールによって促進され、スフィンゴシンによって阻害される(Hannun & Bell, 上記: Hannun & Bell, Science, 243, 500, 1989)。

989 ; Merrill & Stevens, Biochem. Biophys. Acta, 1010, 131, 1989)。

スフィンゴシンは、インビトロで、あるいは100 μ M 未満の濃度ではPK-Cを阻害せず、PK-Cに対する立体特異的効果を示さなかった(Igarashi ら, Biochem., 28, 6796, 1989)。上述の研究の多くは、商業的ソースから得られたスフィンゴシンを使用し(例えば, Sigma Chemical Company)、その副産物は、3-O-メチルスフィンゴシン、5-O-メチルスフィンゴシンおよびN-メチルスフィンゴシンを含む様々な不純物を含有していた。それらの不純物は、副産物の過程、つまりスフィンゴミエリンまたはセレブロシドのメタノール溶液分解から生じたものらしい。さらに、スフィンゴシン骨格中で、キラル炭素に関するD-エリスロ立体配置が、しばしばD-トレオ立体配置に変換される。

Igarashi ら(上記)は、PK-C活性に対するスフィンゴシンの阻害効果が、(1) C1からC3の立体特異的配置(D-エリスロ立体配置が要求される)；(2) 長鎖の脂肪族基の存在；(3) 多分、最も必須なこととして、C2の一般アミノ基に負の電荷を有すること、によるものであることを見出した。アミノ基がN-アセチル化される場合は、アミノ基の負電荷がアセチル化によって除去されるために、PK-C阻害活性は消失した。しかしながら、アミノ基のアニオン特性がN-メ

チル化によって増強される場合は、立体特異的PK-C阻害活性は増強された。

白血球と、活性化された血小板および内皮細胞との相互作用は、炎症過程の開始ステップであり、セレクトイン(selectin)として知られる接着分子のファミリーにより、一部分媒介される。セレクトインには、マウスにおけるHEL-14およびヒトにおけるELAM-1、LAN-1、GMP-140(CD62/PADGEM)が含まれる。セレクトインは、N-末端領域のレクチンドメイン、それに引き続いて、表皮増殖因子配列、糖体調節ドメイン、貫膜領域およびC-末端ドメインからなる、類似の構造モチーフにより特徴付けられる(Stoolman, Cell, 56, 907, 1989およびOsborn, Cell, 62, 3, 1990)。セレクトインファミリーのメンバーは、炭水化物のリガンドに結合する(例えば, Springer, Nature, 346, 425, 1990; Brandley ら, Cell, 63, 861, 1990; Love ら, Cell, 63, 475, 1990; およびValis ら, Science, 250, 1132, 1990 を参照)。

種々のスフィンゴ糖脂質のリボソームを使用した阻害研究に基づいて、HL60細胞(ヒト前骨髄球細胞系)に発現されたELAM-1およびGMP-140の両方の結合エピトープは、シアロシル-Le^xとして同定された(Phillips ら, Science, 250, 1130, 1990およびPolley ら, Proc. Natl. Acad.

Sci., 1991, 印刷中)。

セレクトインの発現は、リンホカイン、腫瘍壊死因子(TNF α)、細菌のリポ多糖類ホルボールエステル、トロンビン、および恐らく多くの他の化合物の誘導効果によって、高い方に調節される。それによって白血球は、血小板を伴って、炎症部位に補給される。腫瘍細胞は、血小板を活性化できるので(例えば, Ugen ら, J. Natl. Canc. Inst., 80, 1461, 1988; Watanabe ら, Canc. Res., 48, 6411, 1988; ならびにCrignani & Jamieson, Blood, 71, 844, 1988)、類似の過程が、微小血管内皮上での腫瘍細胞の接着の際に起こることを予想することができる。従って、腫瘍細胞転移の過程は、セレクトイン依存性腫瘍細胞接着によって開始され得る。腫瘍細胞による内皮細胞の恒久的な活性化の証拠はないが、IL-1またはTNF α で活性化された内皮細胞は、種々の腫瘍細胞に接着することが見いだされた(Valis ら, 上記)。

セレクトイン発現の調節メカニズムは、不十分にしか理解されていないが、それは明らかに、プロテインキナーゼC、Gタンパク質ファミリーのメンバー(例えば, ras, G_i, G_o, G_q など)、および47kDaのリンタンパク質を含む、貫膜信号変換器(transmembrane signaling transducers)の複合配列を含み、それらの全ては、スフィンゴ糖脂質お

よびスフィンゴシン誘導体によって調整されることが見いだされた。血小板凝集および関連するATP分泌は、トリメチルスフィンゴシン(TMS)によって強く阻害される。この現象は、47kDaのタンパク質のリン酸化の阻害、または血小板中の信号伝達経路としてのホスホイノシチドの代謝回転の阻害によって生じるのかもしれない。

TMSは、第四級アンモニウム構造を有し、水性溶液中で優れた溶解性を示す。TMSが、正常細胞中に存在し役割を担っているという明確な証拠はないが、合成的に調整されたTMSは、より低い細胞毒性と、例えば腫瘍細胞および血小板に対するより強い薬理学的効果を有する。従って、TMSは、その効果がスフィンゴイド誘導体に反応する使用において、SNPまたはジメチルスフィンゴシン(DMS)の使用以上の利点を提供する。

発明の要旨

本発明の1つの目的は、悪性腫瘍細胞の転移特性を阻害し、細胞増殖をコントロールし、および異常細胞増殖により特徴付けられる様々な疾患を治療するための、化合物および組成物を提供することである。

本発明の他の目的は、プロテインキナーゼCを阻害する化合物および組成物を提供することである。

本発明のさらなる目的は、血小板凝集を阻害するための

化合物および組成物を提供することである。

本発明の4番目の目的は、炎症を阻害するための化合物および組成物を提供することである。

本発明の他の目的は、N,N,N-トリメチルスフィンゴシンの製造方法を提供することである。

本発明の5番目の目的は、悪性腫瘍を治療し、悪性な腫瘍細胞の転移特性を阻害する薬剤および方法を提供することである。

本発明の7番目の目的は、細胞接着分子発現を調整するための化合物を提供することである。

本発明の8番目の目的は、血栓症を治療するための化合物を提供することである。

本発明の9番目の目的は、好中球活性を調整するための方法を提供することである。

本発明の10番目の目的は、組織の損傷を最小化するための方法を提供することである。

本発明の他の目的は、スーパーオキシドの有害な効果を最小化するための方法を提供することである。

本発明のまたさらなる目的は、生物学的物質の保存を維持し、または延長させるための方法を提供することである。

これら、および他の目的は、N,N,N-トリメチルスフィンゴシンの製造方法の開発、ならびにインビトロおよびイン

ビボで細胞増殖をコントロールし腫瘍細胞の悪性表現型を阻害するその効力の範囲によって、達成された。

N,N,N-トリメチルスフィンゴシンは、他のスフィンゴシン誘導体以上に、プロテインキナーゼC、および腫瘍細胞の転移潜在力に対して、より高い阻害活性を有し；血小板凝集および腫瘍により誘導される血小板相互作用を阻害し；炎症過程を阻害し；細胞間接着分子の発現に影響を及ぼし、水に可溶性であることが見いだされた。N,N,N-トリメチルスフィンゴシンによる腫瘍細胞の転移の顕著な抑制は、プロテインキナーゼCまたは血小板凝集、あるいはその両方に対するその阻害効果によるものであろう。TBS はまた、スーパーオキシド($O_2^{\cdot -}$)の産生を阻害し、それらはナトリウムCの還元(スーパーオキシドは、有害な生物学的作用を持ち得る高度に反応性の分子である。従って、TBS は、スーパーオキシド産生を阻害することによって、組織損傷を最小化できる。)、 O_2 消費、貪食運動(phagocytosis)、質内皮移動、12- ミリスチート13- アセテート(PMA)に誘導されるタンパク質リン酸化、特に65kDa および47kDa の分子量のタンパク質のリン酸化、によって測定され、その2つのタンパク質は、ホスホノシチド中のPIC およびホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニルアラニン(FHLP)-依存性の代謝回転の変化によって影響され得る。

図面の簡単な説明

図1は、N,N,N-トリメチルスフィンゴシンおよび関連化合物の構造を表す。

図2A-Cは、ヒト腫瘍細胞増殖に対するスフィンゴシン誘導体の効果を示す。図2Aでは、ヒト結腸癌細胞系COLO-205の増殖がモニターされた。図2Bでは、ヒト肺癌細胞系LD-65の増殖がモニターされた。図2Cでは、ヒト胃癌細胞系HKN-74の増殖がモニターされた。各図とも、縦軸は、トリチウム化されたチミジン取り込みの阻害パーセントを示し、黒丸はスフィンゴシンを示し、白丸はN,N-ジメチルスフィンゴシンを示し、三角はN,N,N-トリメチルスフィンゴシンを示す。

図3は、腫瘍細胞分化に対する種々の試薬の比較上の効果を表す。HKN-74細胞は、N,N,N-トリメチルスフィンゴシン(白四角)、N,N-ジメチルスフィンゴシン(白丸)、8-クロロ-サイクリックAMP(白三角)、ジブチルサイクリックAMP(黒三角)、スフィンゴシン(黒丸)、およびヘキサメチレンビスアセタミド(黒四角)に曝された。

図4Aおよび4Bは、A431細胞中でのプロテインキナーゼC活性に対するスフィンゴシン誘導体の効果を表す。Erast およびAndersonの標準的なリポソーム(Nature 301, 621, 1983)が使用された。図4Aでは、縦軸は、ミエリ

ン塩基性タンパク質に取り込まれた ^{32}P -ATPの量を示す。

図4Bでは、ヒストンH-8への放射活性の取り込みが、縦軸に示される。両方のパネルとも、SPはスフィンゴシンを示し、HMSはN-モノメチルスフィンゴシンを示し、DMSはN,N-ジメチルスフィンゴシンを示し、TBSはN,N,N-トリメチルスフィンゴシンを示す。

図5Aおよび5Bは、2つのメラノーマ細胞系である、高度に悪性の細胞系BL6(図5A)と、低い悪性の細胞系F1(図5B)に対する、N,N,N-トリメチルスフィンゴシン(白丸)、N,N-ジメチルスフィンゴシン(黒丸)、スフィンゴシン(白四角)の効果を表す。細胞増殖は、トリチウム化されたチミジンのDNAへの取り込みによって実証される。

図6A-Cは、BL6細胞をマウスに静脈注射した後での、肺転移沈着(deposits)に対するN,N,N-トリメチルスフィンゴシンの効果を表す。各グラフは、8匹の動物から得られた結果の、平均値および標準偏差を示す。図6Aでは、白棒は、肺のコロニーの沈着の数を表し；斜線つき棒は、径が1mmより大きい肺コロニーの数を表し；黒棒は、径が1mm未満の肺コロニーの数を表す。棒1-3は、注射より14日後に観察された沈着の数を表す。棒4-6は、BL6細胞を注入され、その1分後に0.2mgのN,N,N-トリメチルスフ

スフィンゴシン (TBS) を注入された動物における脾コロニー沈着の数を表す。棒7-9 は、BL6 細胞および0.2 μ g のTBS を同時に注入された動物における脾コロニー沈着の数を表す。棒10-12 は、BL6 細胞の投与より3時間後にTBS を注入された動物における脾コロニー沈着の数を表す。

図6Bでは、処理より18日後に脾コロニーの数が測定され、この処理は、投与に関する種々の用量および経路から構成されていた。棒1: 3×10^4 個のBL6 細胞を脾臓経路で、棒2: 5×10^4 個のBL6 細胞を皮下経路で、棒3: 3×10^4 個のBL6 細胞を脾臓経路で、およびその1時間後に0.5 μ g のTBS を腹腔内経路で、棒4: 5×10^4 個のBL6 細胞を皮下経路で、およびその1時間後に0.5 μ g のスフィンゴシンを脾臓経路で、棒5: 5×10^4 個のBL6 細胞を皮下経路で、およびその2、3および4日後に0.5 μ g のTBS を脾臓経路で3用量で、投与した。

図6Cには、TBS に対するBL6 の転移能力の用量応答が、示される。棒1は、PBS 中 4×10^4 個のBL6 細胞を脾臓経路で注射された動物の脾におけるコロニー数を含む、対照群を表す。棒2は、100 μ l のPBS 中0.1 μ g のTBS を、BL6 細胞の注射の1分後に注入された動物の脾におけるコロニー数を表す。棒3は、TBS の用量が0.2 μ g まで増加されたことを除いて、同じ様に処理された動物を示す。棒4

クエン酸トリナトリウム、1 μ g/mlのグルコース、および3.5 μ g/mlのウシ血清アルブミンを含むタイロッド緩衝液(pH 6.5)中の 32 P-リン酸(0.2 μ Ci/ml)により、75分間37°Cで、予め標識した。遠心分離(600 \times g, 10 分間)の後、血小板をタイロッド緩衝液(pH 7.2)中に再懸濁し、プラスチック試験管に分注し、種々の濃度のスフィンゴシンおよびその誘導体(最終エタノール濃度0.5%となるように50%エタノール溶液を添加)とともに、37°Cで5 分間、ブレインキューベートした。次に、血小板を、トロンビン(10 μ M)で刺激した。30秒後に、5 \times 試料用緩衝液を添加して、反応を停止させ、試料を溶解させて、10% SDS-ポリアクリルアミドゲルにかけた。タンパク質を、電気泳動的に分離した。レーン1は、トロンビンによる刺激を受けない対照群; レーン2は、1 μ Mの γ -トロンビンで刺激されたもの; レーン3は、トロンビンで刺激して1 μ MのTBS を添加したもの; レーン4は、トロンビンで刺激して10 μ MのTBS を添加したもの; レーン5は、トロンビンで刺激して20 μ MのTBS を添加したもの; レーン6は、トロンビンで刺激して30 μ MのTBS を添加したもの; レーン7は、トロンビンで刺激して20 μ Mのスフィンゴシンを添加したもの; レーン8は、トロンビンで刺激して20 μ MのN,N-ジメチルスフィンゴシンを添加したもの、である。

は、TBS の用量が0.5 μ g であったことを除いて、同じ様に処理された動物を示す。棒5は、まずPBS 中0.5 μ g のTBS を注射され、その1分後に、100 μ l のPBS 中 4×10^4 個のBL6 細胞を注射された動物を示す。処理より18日後に、マウスは屠殺され、脾を開き、脾中のコロニーの数が、解剖顕微鏡下に計数された。

図7Aおよび7Bは、血小板凝集に対するN,N-トリメチルスフィンゴシン(TBS) の効果を表す。ヒト血小板凝集(タイロッド緩衝液(Tyrode's buffer) 1 μ l 当たり $3-5 \times 10^5$ 個の血小板)の0.45mlのアリコートに、スフィンゴシンまたはTBS とともに2分間インキューブした。次に、 γ -トロンビン(図7A)またはアデノシン三リン酸(ADP)(図7B)のいずれかを0.05ml添加することにより、血小板凝集を誘導した。凝集度は、血小板凝集計で測定し、データを集積コンピューター(Kyoto Daichi Kagaku Co. Ltd.) で分析した。

図8は、さらに、スフィンゴイドによる血小板凝集の、用量応答を表す。血小板の凝集は、10nMの γ -トロンビンで誘導した。

図9は、ヒト血小板の40kDa タンパク質の、 γ -トロンビンで誘導されるリン酸化の、スフィンゴシンおよびTBS による阻害を表す。ヒト血小板(3×10^5 / μ l)を、22nMの

図10は、マウスT細胞系CTLに対するスフィンゴシン誘導体の効果を示す。各点は、3つの反復実験の平均値である。この図の中で、DMS は、N,N-ジメチルスフィンゴシンを表し、TBS は、N,N-トリメチルスフィンゴシンを表す。

図11Aおよび11Bは、種々の薬剤に曝された後に抗GMP-140 抗体と結合できる血小板のパーセンテージを評価する、代表的実験の結果を表す。結合活性のパーセンテージは、フローサイトメーター(flow cytometer)で測定した。SPN は、スフィンゴシン; H-7 は、1-(5-イソキノリニルスルホニル)-2-メチルピペラジン; Cal は、カルホスチンC(calphostin-C); TBSは、トリメチルスフィンゴシン; DMS は、ジメチルスフィンゴシン、である。

図12Aおよび12Bは、血小板に結合するBL60の度合いを評価する、代表的実験の結果を表す。血小板は、阻害性化合物(シンボルは、図11Aおよび11Bの凡例にあるのと同様)に曝され、マイクロタイタープレートのウェルに付着された。トリチウム化されたチミンで標識されたBL60細胞を、ウェルに導入し、結合した放射活性の量を評価した。

図13Aおよび13Bは、肝中球の機能に対する種々の試験の効果を表す。図13Aでは、 10^4 個の肝中球/ml に

よる、スーパーオキシドで媒介されるチトクロームCの還元(Clifford, Meth. Enz., 105, 393, 1981)をBeckman DU-50 分光光度計でOD₃₁₀ および21000/l/cmの吸光率でモニターすることによって、O₂ 産生に対するTBS の効果測定した。細胞を、1 μM PMA で刺激する(時間0)前に、指示された濃度のTBS と、室温で10分間ブレインキューベートした。図13Bでは、オキシドラジカル(oxyradical)産生が、15 μM TBS に阻害されると、直ちに阻害されたことが注目される。

図14は、肝細胞のO₂ 消費に対する、種々の試薬の効果を示す。Clark タイプの電極および酸素モニターを、製造者(V.S.I. Inc., Yellow Springs, OH)の推奨に従い空気で飽和された水を使用して、カリブレーションした。100%の読みは、空気飽和水中の酸素の濃度に等しいと考えられた。

発明の詳細な説明

N,N,N-トリメチルスフィンゴシン(TMS)は、特に生理学的pHで、高度に水溶性である。従って、この化合物は、細胞増殖の調整物として、水溶性がより低いスフィンゴシン、N-モノメチルスフィンゴシンおよびN,N-ジメチルスフィンゴシンとは異なる利点を有する。

本明細書で使用されるとき、スフィンゴシンは、D-、L-

ら合成的に調製される。例えば、非置換スフィンゴシン(Sigan Chemical Company)は、周知の方法により誘導体化されて、化合物(4E)-N,N-ジメチル-D-エリスロー-スフィンゴシンを形成できる(Igarashiら, JBC, 265, 5385, 1990)。そのようにして得られたN,N-ジメチルスフィンゴシンは、ほとんど定量的収量で四級化する。

調製に述べると、約37%のホルムアルデヒド水溶液(約20当量)を、酢酸緩衝液中(NaOAc-AcOH-H₂O, pH4.5)のD-エリスロー-スフィンゴシン溶液に添加する。この溶液を、室温で約10分間混合し、次に、氷凍化水素シアノナトリウム(sodium cyanoborohydride)(NaBH₄-CN)を3回添加する(それぞれ、約3.0、2.0、1.0当量)。過剰のメタノールを、5分間の間隔で、連続的に添加する。この溶液を、“N-EVAP”(Organomation Assoc., Inc., South Berlin, MA)中窒素気流下で濃縮し、化合物をクロロホルムで抽出する。量が多いときは(約5-10mgより多いとき)、この溶液をロータリーエバポレーター中で減圧下に、さらに濃縮することが推奨される。

抽出物を、標準手順を使用して、高圧薄層クロマトグラフィにより精製する。この技術によると、化合物は、CHCl₃:MeOH:NH₄OHを体積比率にして8:2:0.2の割合で含む緩衝液中で、約0.8のR_fを有する。

エリスロー、スレオ-配位にかかわらず、スフィンゴシンを示す。

さらに本明細書で使用されるとき、「細胞」は、有核および無核の細胞を含む。従って、リンパ球および内皮細胞のような「古典的」細胞に加えて、赤血球および血小板のような生物学的構造は、この用語の範囲内にある。

本明細書で使用されるとき、血液または血液産物には、全血、密封された(packed)白血球または密封された血小板のような血液細胞調製物、などの体外に取り出されたものが含まれる。

さらに本明細書で使用されるとき、「合成的に調製された」とは、商業的に入手可能な試薬および構成ブロックから調製され、インビトロで化学反応により、スフィンゴシンおよびその誘導体に組み立てられる製造物を意味する。あるいは、スフィンゴシンは、天然に生じるスフィンゴ脂質から調製される。

高分子スフィンゴシンの多官能性により、完全メチル化(Sommer ら, J. Org. Chem. 36, 824, 1971)による直接的な四級化(quaternization)または水性ホルムアルデヒド(CH₂O/NaH₂PO₄)を使用する還元性メチル化は、常に再現性があるとはいえない。代わりに、N,N,N-トリメチルスフィンゴシンは、商業的に入手可能な非置換試薬か

上述のように調製されたN,N-ジメチルスフィンゴシンは、無色のシロップとして、約80%の収率で得られた。この分子は、高分解能質量分析(high resolution mass spectrometry)によって推定されるところでは、式量329.3281および化学式C₂₈H₅₃NHNO₃を有する。

次に、約30ミリグラム(0.091m/mol)の(4E)-N,N-ジメチル-D-エリスロー-スフィンゴシン(DMS)を、約1.5mlの無水クロロホルム中に溶解する。新しく蒸留したヨードメタン(約170 μlの体積、2.73m/mol)をDMS溶液に添加し、混合物を暗所で室温で、攪拌する。(過剰のヨードメタンの量は、問題ではなく、25-100%の過剰量が満足のいく結果をもたらす)。

反応は、一般に数時間で完了するが、便宜的にこの混合物を、一夜放置する。反応の進行は、酢酸エチル:メタノール:水酸化アンモニウムを20:10:2の比率で含む緩衝液を使用して、薄層クロマトグラフィ(TLC)によりモニターできる。インキュベーション後に、沈殿した第四級アンモニウム塩を、水で希釈し、次に、クロロホルム(3al×4)で繰り返し抽出する。有機層を、硫酸マグネシウム上で乾燥し、次に、真空中で濃縮する。

上述の方法を実施すると、37mg(88%の収率)の化合物が、黄色い結晶として得られた。

この黄色い結晶を、予め中性化した (pH=7.00) 陰イオン交換樹脂 (塩化物形態、Dover 1 × 2-400, 500mg) の水性懸濁液中で、室温で3時間、攪拌しながら溶解させる。次に、混合物を、焼結したガラス製漏斗で濾過し、続いて凍結乾燥する (8ミリトルで2日間)。

上述の方法を実践すると、26.5mg (93%収率) のN,N-トリメチルスフィンゴシンの塩化物塩が得られた。この産物の構造を、プロトン核磁気共鳴 (500MHz, CDCl₃) により確かめ、9個の水素基およびトリメチル誘導体化アミノ基を含有することを見出した。¹H-NMR (D₂O) δ 0.88 (t, 3, J=6.8Hz, 3e); 1.31 (br s, 22, 11x CH₂); 2.08 (s, 2, J=5.8Hz, 2xH-6); 3.29 (s, 9H, 3e); 3.38 (br s, 1, H-3); 4.13 (br s, 2, 2xH-1); 5.57 (dd, 1, J=3.1および2.4Hz, H-4); および5.80 (s, 1, H-5)。化合物の推定分子式は、C₃₁H₄₄N₂O₂で、予算分子量は、342.3372であり、質量分析は、式量342.3371を示す (C₃₁H₄₄N₂O₂, Δ-0.0003)。

細胞増殖に対するTMSの効果は、インビトロおよびインビボで、種々の腫瘍細胞をこの化合物に曝すことによって、部分的に示される。比較の目的で、それらの同じ試験用細胞もまた、スフィンゴシンおよびN,N-ジメチルスフィンゴシンに曝す。他の2つの化合物にまさるTMSの顕著な利点

は、その水溶性である。N,N-ジメチルスフィンゴシンおよびスフィンゴシンは、塩化物塩としてわずかに酸性pHで、水に可溶性である。中性または生理学的pHで、それらの溶液は、不透明な懸濁液を形成する。TMSは、酸性、中性、またはアルカリ性条件下で可溶性であり、安定で清澄な溶液を提供する。

トリチウム化チミジン取り込みに依存するインビトロアッセイは、細胞増殖に対する種々の化合物の効果を測定するために、使用され得る。簡潔に述べると、腫瘍細胞を、平底96ウェルプレート (Corning, NY) に、ウェル当たり2 × 10⁴細胞の濃度で、播く。細胞を、PBS溶液として添加されるスフィンゴイドを種々の濃度で含むDMEM中で2日間、培養する。次に、この培養物に、トリチウム化チミジンをウェル当たり0.5 μCiの濃度で補足する。6時間のインキュベーションの後、細胞をPBS Cell Harvester (Cambridge Technology, Cambridge, MA) を用いて集め、取り込まれた放射活性を、適切な細胞溶解剤およびシンチレーション用反応液、例えばScintiverse BD (Fisher Scientific, Fairlawn, CA) のような、その両方の機能を発揮するものを添加した後に、測定する。

3つの癌細胞系を、検査した; ヒト結腸癌細胞系Colo-205 (ATCC No. CCL222); 肺癌細胞系Lu-65 (T. Yanadaら、

Jpn. J. Cancer Res., 76, 987-976 (1985)); および腎癌細胞系HXN-74 (Motoyamaら、Acta Med. Biol., 27, 49-63 (1979))。

図2に表されるように、各場合とも、TMSは、腫瘍細胞増殖を阻害する能力において、スフィンゴシンよりも優れていた。(それらの図では、結果は、試験用物質に曝されなかった対照群の培養に対する、細胞増殖の阻害をパーセントで表している。) TMSは、DMSよりも利点があることを示したが、同じ大きさではなかった。にもかかわらず、TMSにはDMSにまさる効力の増加があるため、特定のレベルの阻害を生じるために、より少ない量が必要とされた。

TMSの増強された阻害活性は、図3に要約されるデータ中で確認される。HXN-74細胞を、分化誘導による腫瘍細胞増殖を阻害するものとして知られているcAMPおよびその誘導体、ならびにRXBAに曝した。明らかに、TMSは、腫瘍細胞増殖の最も有効な阻害剤であった。

他のインビトロアッセイで、PK-C活性に対する種々の化合物の影響をモニターできる。ある種の腫瘍細胞は、高レベルのPK-C活性を示す。ヒト腹膜癌細胞系A-431 (ATCC No. CRL 1555)は、Igarashiら (上記) に記載されているように、PK-C活性のバイオアッセイに使用することができる。簡潔に述べると、有機溶媒、エタノール、またはエタノール/クロロホルム中にホスファチジルセリン (5 μg/試験管) および1,2-ジオレイン (0.05 μg/試験管) を、適切な量のスフィンゴシン誘導体試料とともに、またはともなわずに、1.5ml試験管 (Sarstedt) に加え、混合物を、N₂気流下に蒸発させる。脂質混合物には、30 μlの20mM Tris-HCl (pH 7.5) 中で30分間、超音波処理する。得られるリボソームを、25mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM MgCl₂, 400 μM EDTA, 50 μM EGTA, 500 μM CaCl₂, 200 μg/mlのヒストンH1-Sまたはミエリン塩基性タンパク質、および20 μM γ-[³²P]-ATP (2 × 10⁴ cps) を含有する緩衝液混合物を最終容積約80 μlまで補足する。

Igarashiら (上記) に記載されているA431細胞から、またはKikkawaら (Biochem. Biophys. Res. Comm., 135, 636, 1986) に記載されているマウス癌から調製される、約1-2 μgのタンパク質を含む、約10 μlのPK-Cを添加することにより、反応を開始し、混合物を10分間30℃でインキュベートする。反応を、25% TCA および1% BSAを含む1 mlの1 M ATP溶液 (pH 7.5) を添加することによって停止させる。沈殿物を、遠心分離によって集め、1 mlの25% TCA で2回洗浄し、次に0.1%のデオキシコレートを含む1 mlの1 M NaOH中に、わずかに熱しながら溶解し (80℃で10分間)、シンチレーションカウンターで計数した。ホスファチジルセ

リン/クロロホルム中にホスファチジルセリン (5 μg/試験管) および1,2-ジオレイン (0.05 μg/試験管) を、適切な量のスフィンゴシン誘導体試料とともに、またはともなわずに、1.5ml試験管 (Sarstedt) に加え、混合物を、N₂気流下に蒸発させる。脂質混合物には、30 μlの20mM Tris-HCl (pH 7.5) 中で30分間、超音波処理する。得られるリボソームを、25mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM MgCl₂, 400 μM EDTA, 50 μM EGTA, 500 μM CaCl₂, 200 μg/mlのヒストンH1-Sまたはミエリン塩基性タンパク質、および20 μM γ-[³²P]-ATP (2 × 10⁴ cps) を含有する緩衝液混合物を最終容積約80 μlまで補足する。

リン、1,2-ジオレインまたは Ca^{2+} を含まない反応混合物を、対照群として使用する。

2つの異なる基質である、ヒストンH-Sおよびミエリン塩基性タンパク質を使用した一連の実験からのデータは、図4に要約される。基質とは無関係に、TNSは、PR-Cを阻害する能力において、他の化合物より優れていた。

これらのデータは、残りの試験された化合物にまさる、TNSのより優れたPR-C阻害活性を示すが、TNSには他の利点がある。ある種の癌細胞は、他の癌細胞より高い転移潜在力および侵襲能力を示す。例えば、BL6およびF10メラノーマ細胞系(cell line)は、高度に転移性で侵襲性である。他方、F10細胞は、転移性および侵襲性においてかなり劣る。(I. R. Hartら, *Am. J. Pathol.*, **97**, 587-592(1978); G. Pooteら, *Cancer Res.*, **42**, 2770-2778(1982); ATCCからのF1およびF10クローンである、それぞれCRL 5323およびCRL 6475)。

BL6およびF10細胞を、上述のようにインビトロで試験した。図5に示すように、TNSは、細胞増殖の阻害において、DMSおよびスフィンゴシンよりも効果的であった。また、TNS処理に対して、BL6細胞はより敏感であり、それは、より低い濃度に対してTNSのカーブが左方に移動することによって示された。

開始に中心的な重要性を有する。血小板活性化および活性化の多くの過程に影響する、多くの因子およびメカニズムがある。セレクトリンGMP-140は、好中球、HL60細胞またはシアロシル- Le^x を発現する腫瘍細胞に結合する。GMP-140の発現および、それに続くシアロシル- Le^x に対する結合のメカニズムは、腫瘍細胞の転移と同様に、炎症プロセスの開始にとって中心的な重要性を有する。GMP-140の発現は、TNSとブレインキューベートすることによって、下方に調整されるか、または阻止される。血小板に対するTNSの細胞毒性効果の可能性は、血小板がTNSとインキューベートされた後に、正常なリストセチン誘導凝集を示すという事実によって、明らかに排除される。

TNSの有用性は、悪性細胞の増殖の抑制に限定されない。炎症は、リンパ系および骨髄系細胞の増殖によって、一部分特徴付けられる。一般に、増殖は、受傷の後の外傷性抗原の壊死巣分離または回復増殖能力の増強のような、有利な目的に寄与するが、時として、例えば自己免疫性腸炎障害のような、異常な事態として発生することがある。従って、TNSは、明らかに正常な細胞の細胞増殖のコントロールに有用性を有する。

例えば、マウスのTリンパ細胞系であるCTLL-2細胞(ATC C No. TIB 214)を、ウェル当たり 1.5×10^4 細胞でプレー

TNSのインビトロでの有効性は、図6を含むグラフに要約される。BL6細胞を、マウスに注射し、肺中の転移沈着、転移の経路およびタイミングを含めた種々の処理の後に、評価した。早期の処理が好ましく、繰り返し処理することがより好ましいけれども、TNSは、肺の転移増殖(colonization)および腫瘍の発育の抑制において、経路またはタイミングにかかわらず、効果的である。パネルBおよびCに要約されるデータで明らかにされるように、肺腫瘍の転移増殖は、TNSに対して、異なる用量応答があった。

TNSの他の側面は、血小板凝集に対して、それが有する強い効果である(本発明の目的のために、血小板は、細胞と見なされる)。図7および8に要約されるデータで示されるように、TNSは、血小板凝集を用量応答的様式により阻害した。

トロンビンによる刺激により、血小板の40kDaのタンパク質が、リン酸化される。図9で注目されるように、TNSに曝すことによって、血小板の40kDaタンパク質のリン酸化が阻害される。その報告に拘束されることを望むものではないが、本発明者は、リン酸化された40kDaタンパク質の非存在が血小板凝集を妨げるものと信じている。

血小板の活性化は、止血、炎症、傷治癒および腫瘍細胞転移ならびに侵襲に関連する、無数の生物学的プロセスの

トとして、試験用物質に曝した。細胞増殖を、チミジン取り込みによりモニターした。いくつかの実験のデータを図10に要約する。TNSは、CTLL-2細胞増殖の抑制に効果的であった。

従って、本発明は、ヒトまたは動物の細胞を、細胞増殖阻害剤のN,N-トリメチルスフィンゴシンまたはその薬学的に許容できる塩に曝す工程を包含する、該ヒトおよび動物細胞の増殖を阻害する方法を提供する。

TNSは、プロテインキナーゼCおよび他のキナーゼに対して阻害活性を有する故に、本明細書に記載のような血小板凝集阻害および細胞接着阻害活性に加えて、TNSは、細胞内ATP貯蔵の消費を恐らく妨げ、よって代謝活性を弱める。従って、TNSは、血液産物のような生物学的物質の貯蔵を維持し、または延長するために使用されることができ

る。例えば、TNSは、インビトロで通常の血液保存条件下で、赤血球の代謝活性を遅らせることが見出されており、これは赤血球の酵素活性の減少によって実証された。類似の結果を、白血球および血小板についても予想することができ

る。従って、TNSは、生物学的物質の維持または貯蔵のために現在使用されている方法および製剤の付属物として、使

用されることができる。TNS の細胞増殖阻害量を、貯蔵媒体に添加することができる。

好中球（多形核白血球）は、通常3つの主要な機能により明示される、3つの主要なアゴニスト-依存性応答を誘発する：(i) スーパーオキシド (O_2^-) を産生する酸化性 (oxidative) のバースト；(ii) 食食運動性の移動活性 (phagokinetic migratory activity)；および (iii) 活性化された内皮細胞 (EC's) および血小板と相互作用する能力。(ii) および (iii) のメカニズムにより、EC's への接着および、EC 単層を貫いて血管または血管外マトリックスへの移動が生じる。通常、これらの機能は、全体として、微生物を炎症性の応答に導くための有用なメカニズムを提供する。しかしながら、炎症性疾患の際の、好中球の蓄積および過剰作用は、組織損傷および循環障害を生ずる。

好中球の応答は、酸化性ペプチド（例えば、ホルミル-Met-Leu-Phe）(fMLP)、アラキドネート、短鎖のジアシルグリセロール (DAG, CG-DAG) およびホルゴールエステル類（例えば、PMA）を含む、無数の刺激物により、引き起こされる。

当業者に周知の方法を使用して得られる好中球中でのスーパーオキシド産生は、（例えば、チトクローム C の還元により測定される、Najjar, Blood, 64, 534, 1984 を参

照のこと）TNS により、用量依存性に阻害される（図 1 3 A および 1 3 B）。TNS (20 μ M) は、完全にスーパーオキシド産生を排除する。（チトクローム C の還元は、Clifford, Meth. Enz., 105, 393, 1981 の方法のような既知の方法を使用してモニターされる。好中球の O_2^- 消費は、酸素モニターおよびマイクロ O_2 、チャンパーアセンブリー (Y. S. I. Inc., Yellow Springs, OH) を使用する電気伝導率により測定でき、PMA により有意に増強される。 O_2^- 消費の PMA-依存性増加は、TNS によって、強く阻害される（図 1 4）。

金コロイド被覆プレート (gold sol-coated plate) 上での好中球の食食運動活性 (phagokinetic activity) は、特に Albrecht-Boehler (Cell, 11, 395, 1977) に教示されているような技術によって、測定されることができる。食食運動活性は、1.5 μ M 程度の低さの TNS によって有意に抑制され、4.5 μ M TNS では完全に抑制される。TNS-依存性阻害効果は、培養培地が TNS を含まない培地で代替されるときは、完全に逆転される。従って、食食運動活性に対する TNS の阻害効果は、細胞毒性に依存性ではない。

好中球の特色は、活性化された EC's に接着し、EC 単層を貫いて血管または血管外マトリックスに移動する能力である。好中球と EC's との相互作用に対する TNS の効果、およ

びそれに続くそれらの真内皮移動は、ヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC's) (Luscinskas et al., J. Exp. Med., 176, 1617, 1991) を使用して、インビトロでモニターできる。好中球を HUVEC 単層に添加し、好中球-HUVEC 相互作用を、単層切片の固定、包埋 (embedding)、染色の後で、顕微鏡下に評価する。

生理学的条件下で、好中球は、EC 単層を貫いてコラーゲン性のマトリックス中に移動することができる。EC's が、M199 培地中で IL-1 β で 4 時間、活性化されると、好中球は、90 分以内にコラーゲン性のマトリックス中に移動する。好中球の移動は、好中球を 8 μ M TNS で前処理することにより、強く阻害され、好中球を 25 μ M TNS で前処理すると完全に阻害される。

IL-1 β により活性化される好中球の EC 単層を貫く移動に対する TNS および他のプロテインキナーゼ阻害剤の、用量依存性阻害効果は、表 I および II に要約される。TNS (15 μ M) は、細胞の生存度に影響を与えることなく、EC 単層を貫いて移動する細胞数を大いに減少させる。スタウロsporin (staurosporine) およびカルホスチン C は、EC's に著しい形態学的傷害を生じるが、カルホスチン C (5 μ M)、20 μ M B7 および 2 μ M のスタウロsporin は、同様の細胞毒性効果を生ずる（表 II および IV）。

TNS (15 μ M) は、有意な細胞毒性を示さないが、15 μ M

SPN および 15 μ M DNS は、12-13% の細胞毒性を示す。25 μ M では、SPN および DNS は、好中球に対して主要な細胞毒性的傷害を生じるが、TNS の効果は、無視してよいほどのものである（表 V）。

表 I

プロテインキナーゼ阻害剤による食食運動活性の抑制

阻害剤*	通過領域	N
対照群	100 \pm 25% *	178
TNS (4.5 μ M)	16 \pm 18	93
SPN (4.5 μ M)	14 \pm 7	72
DNS (4.5 μ M)	26 \pm 25	132
B-7 (200 μ M)	27 \pm 6	75
スタウロsporin (0.2 μ M)	13 \pm 12	68
カルホスチン C (0.5 μ M)	39 \pm 11	65
セラミド (4.5 μ M)	109 \pm 25	62

* 平均値 \pm 試料標準偏差

§ 好中球の通過領域 (area swept) は、単層の写真で測定される。次に、好中球の動きにより明らかにされる領域は、切り取られ、重量を測定された。

+ B-7 は、Seikagaku Kogyo (Tokyo, Japan) から得た；スタウロsporin およびカルホスチン C は、Kaniya Biochem

ical Co. (Thousand Oaks, CA) から得た。およびセラミドは、Sigma から得た。

表 II

好中球の移行(transmigration)に対する

TNS およびセラミドの効果

μ M	TNS	セラミド
0	100 \pm 17*	100 \pm 17
4	96 \pm 18	82 \pm 24
8	88 \pm 28	ND
15	41 \pm 8.7	87 \pm 27
25	6.8 \pm 4.1	ND
45	1.2 \pm 1.2	83 \pm 16

★ 平均値 \pm 試料標準偏差 (N=25)

BOVEC's および好中球を有するコラーゲン床(collagen bed)の横断面(2 μ m)は、KPL Y10 および Ph2 Neofluor 16 レンズを装着した Zeiss 光学顕微鏡を使用して、観察された。移行(transmigrate)した細胞の数は、各視野ごとに計数した。

ND= 試験を行っていない。

★ 平均値 \pm 試料標準偏差

★ 好中球は、試験管中で、10分間、12 μ M の標記の処理により、プレインキュベートされ、次に、単層に分配された。処理の試薬は、その手順の後で、200-倍に希釈された。

表 V

好中球の生存度

μ M	セラミド	TNS	SPN	DMS
0	97 \pm 3 *	97 \pm 3	97 \pm 3	97 \pm 3
5	98 \pm 2	98 \pm 2	95 \pm 3	96 \pm 3
15	96 \pm 1	97 \pm 3	87 \pm 5	88 \pm 8
25	-	83 \pm 6	53 \pm 18	29 \pm 5
45	91 \pm 3	63 \pm 8	5 \pm 5	0 \pm 1

★ 平均値 \pm 試料標準偏差 (N=8)

好中球の濃度は、0.8 から 1.7×10^6 /ml の範囲であった。生存度は、トリパンブルー排除アッセイにより評価された。グルタメートおよびビルベートを有し、FSC を有しない、SPN 1640 中の細胞懸濁液を、エフェクターとともに37°C で10分間インキュベートした。アリコートをし、等量のトリパンブルー溶液と混合し、直ちにNikon 光学顕微鏡下に計数した。

表 III

内皮単層を貫く好中球の移行に対する

様々なPEC 阻害剤の効果

効果	細胞数/視野	生存度
対照群	100 \pm 14*	94 \pm 2.1
15 μ M TNS	39 \pm 17	97 \pm 2.9
15 μ M SPN	36 \pm 12	87 \pm 5.3
200 μ M B-7	38 \pm 12	79 \pm 7.1
2 μ M スタウロsporin	52 \pm 25	83 \pm 3.6 ★★
5 μ M カルホスチンC	19 \pm 8.9	46 \pm 5.5 ★★

★ 平均値 \pm 試料標準偏差 (N=25)

★★ BVEC's に対する有意な形態学的傷害

表 IV

エフェクターからの貪食運動活性の回復★

処理	通過領域	N
対照群(v/oさらにインキュベート)	100 \pm 25+	178
対照群(0.1% エタノール)	92 \pm 30	118
TNS(12 μ M)	92 \pm 34	77
SPN(12 μ M)	42 \pm 24	86
DMS(12 μ M)	32 \pm 19	112

細胞内ATP を濃縮するために[32 P] リン酸ナトリウム (2mCi) で1時間代謝標識した好中球を、1.5 μ M PMA で刺激するとき、SDS-PAGEを行った後の2つのタンパク質のバンドは、非常に増強されたリン酸化を示す。これらのタンパク質は、約47kDa および65kDa の分子量を有する。好中球を、15-45 μ M のSPN、DMS またはTNS とともにプレインキュベートし、続いてPMA で刺激するとき、両方のタンパク質のリン酸化は、有意に減少する。リン酸化に対する阻害効果は、インキュベーションより2分以内に観察される。リン酸化された47kDa および65kDa のタンパク質は、PK-Cの直接的な基質であるように考えられるので、SPN、DMS およびTNS の阻害効果は、PK-Cに対する阻害効果を紹介しているかもしれない。

[32 P] リン酸ナトリウム (4mCi) のホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルイノシトール-4-リン酸(PIP) およびホスファチジルイノシトール-4,5-ビス-ニリン酸(PIP2)への代謝的取り込みは、定量化可能なfILP(1 μ M) によって増強される。fILP- 依存性の増強は、好中球を5 μ M TNS でプレインキュベーションすることにより、強く抑制される。PIP およびPIP2中のfILPに阻害されるリン酸化の相対強度、およびPIP およびPIP2への 32 Pの代謝的

取り込みに対するSPN、DNSおよびTNSの効果は、表VIに要約される。

表 VI
ホスホイノシチドの代謝回転に対する

TNS、DNS および SPN の効果		
エフェクター	PIP	PIP2
対照群	100	100
1 μ M INLP	182 \pm 39 [★]	147 \pm 82
5 μ M TNS プラス INLP	127 \pm 19 [★]	98 \pm 7.2 [★]
5 μ M SPN プラス INLP	174 \pm 37	128 \pm 13
5 μ M DNS プラス INLP	146 \pm 27	109 \pm 17 [★]

★、平均値 \pm 試料標準偏差(N=6)

★₁、 $p < 0.05$

★₂、 $p < 0.02$

★₃、 $p < 0.01$

PIP および PIP2 中の ³²P の量は、TLC 分離を使用して測定した。TLC プレート上のスポットは、こすり取られ、その中の放射活性は、Beckman シンチレーションカウンターで測定した。各スポットは、対照群の試料と同一のスポットを有する強度に関して、比較された。

ながら、血小板を TNS に曝すと、GMP-140 の発現が阻害される。従って、TNS は、細胞接着分子依存性プロセスに依存する疾患に有用であろう。先に言及したように、GMP-140 は、ELAM-1 と同様に、シアロシル-L^a に結合する。従って、TNS は、受傷部位での炎症状態の進展のような、リンパ球-内皮細胞接着、およびそれに続く細胞間の相互作用を妨害することにおいて、有用性を見出すだろう。

本発明の薬剤の適切な用量は、特定の医学的用途、例えば、疾患の重症度、個体の体重、個体の年齢、循環中の半減期、などに依存し、当業者に容易に決定されることができ、投与数、1日量および治療の過程は、個々に変動しても良い。

TNS は、経口的、非経口的、および局所的などの種々の方法により投与される。本発明の薬剤のための適切な薬学的に許容できる担体、希釈剤、または賦形剤は、その薬剤の特定の医学的使用に依存し、当業者に容易に決定される。

この薬剤は、錠剤、カプセル、バルクまたは単位用量の粉末あるいは顆粒のような種々の形態をとることができ、リポソーム中に含有されても良く、または溶液、乳濁液、懸濁液、軟膏、パスタ、クリーム、ゲル、泡末、ゼリー中に調剤されることができ、非経口的投与形態には、溶液、

本発明は、(1) 治療の有効量の D,L-トリメチルスフィンゴシンまたは薬学的に許容できるその塩；および(2) 薬学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤、を含有する、ヒトおよび動物細胞の増殖ならびにヒトおよび動物の血小板凝集を抑制するための薬剤および治療を提供する。

それらの薬剤および方法は、インビトロおよびインビボの両方での用途に適用できる。個別の使用には、悪性疾患、良性腫瘍の増殖、炎症、免疫系異常に関する他の症状発現、および免疫系が不適切に、または過剰に刺激に対して応答するときの、治療が含まれる。

この薬剤は、有効量の TNS および薬学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤、を含有する。有効量の TNS は、当業者に周知の方法、例えば、本明細書に記載されているか、または非ヒト霊長類のような適切な動物モデルで用量応答曲線を確立し、ヒトに対して推定し、適切なインビトロのデータから推定することにより、または臨床治療での有効性を測定することにより、決定できる。

トリメチルスフィンゴシンはまた、細胞接着分子に対して、強い効果を有する。その効果は、血小板による、細胞接着分子発現の阻害によって、実証される。例えば、トロンピンは、血小板中で GMP-140 の発現を誘導する。しかし

懸濁液などが含まれる。薬剤は、あらゆる種々の、当業者に周知の賦形剤、希釈剤、充填剤などを含有する。そのような補助的成分には、崩壊剤、バインダー、潤滑剤、界面活性剤、乳化剤、バッファー、モイスタライザー、溶解剤、および保存剤が、含まれる。当業者は、TNS を含有し、多くの出典および参考、例えば "Goodman & Gilman's, The Pharmaceutical Basis of Therapeutics" (5版, Goodman 編, MacMillan Publ. Co., NY, 1980) から指針を得て、適切な製剤を形成できる。

持続的な細胞増殖によって特徴付けられ、あるいは機能障害による細胞増殖阻害を要求し、比較的到達しにくい体の部位では、TNS は、有効な局所的濃度を確実にするために、適切な方法で投与され得る。例えば、TNS は、アボー製剤またはアジュバントに入れて注入され、あるいは一定の時間、定められた量の TNS をゆっくりと放出する外科的に設置されたインプラント(implant)またはレザバー(reservoir)中で送致されても良く、または異常な細胞増殖をもたらす部位との結合能力を有する認識分子と複合体化されても良い。そのような予想されるシナリオの例は、骨髄特異的抗原に対して結合特異性を有する抗体という認識分子であり、該骨髄特異的抗体は、TNS に複合体化され、該複合体は、白血病の患者に投与される。

本発明の特定の局面は、下記の非限定的な実施例に記載される。特に言及されることがない限り、すべての量および単位は、 v/v または v/v 関連である。

実施例 1

血小板を、血小板に富む血漿 (Oregon Red Cross, Portland, OR から購入) から分離した。遠心分離 (300 × g で 10 分間) により、除去した (80 × g で 10 分間)。遠心分離 (300 × g で 10 分間) により血小板を得て、22 mM クエン酸トリナトリウム (trisodium citrate) および 0.35% (w/v) BSA を含むタイロッド緩衝液中 (pH 6.5) で一度洗浄し、同じ緩衝液中に再懸濁して、 $1-2 \times 10^8$ 個の血小板/ml の濃度を得た。すべての手順は、室温で行われた。

タイロッド緩衝液中の血小板懸濁液 (3.5×10^8 / ml) を、種々の阻害化合物 (E-7 は、[1-(5-イソキノリニルスルホニル)-2-メチルピペラジン]であり、Seikagaku America Inc., St. Petersburg, FL から購入した合成プロテインキナーゼ C 阻害剤である)、カルホスチン C [Dr. Saitoh, Kyowa Hakko Co., Ltd., Machida, Tokyo, Japan から購入した合成プロテインキナーゼ C]、スフィンゴシン [Sigma, St. Louis, MO から購入]、およびジメチルスフィンゴシンおよびトリメチルスフィンゴシン [Igarashi ら, Biochem., 28, 6795, 1989 に従って合成された] とともにブ

トした。血小板を、1% (v/v) BSA を含有する PBS で 2 回洗浄し、50 μ l のフルオロセインイソチオシアネートで標識したヤギ抗マウス Ig (Tago Co., Burlingame, CA から購入) を補足し、室温で 30 分間インキュベートし、再度 1% (v/v) BSA を含有する PBS で 2 回洗浄した。陰性の対照群として、パラホルムアルデヒドで固定した血小板を、mAb AC1.2 の代わりにマウス IgG とともにインキュベートし、上述のように処理した。

血小板を、適切なゲーティング (gating) を行いながら、Epics フローサイトメーター (Coulter Corp.) で分析した。種々の試薬の阻害効果を計算するために、残りの血小板 (活性化因子なしの血小板インキュベーションから得た) の平均蛍光強度を、活性化血小板試料の値から減じた。

代表的実験の結果は、図 1 1 A および 1 1 B に要約される。TNS は、10-20 μ M で、GMP-140 発現を強く阻害した。DNS は、トロンビンまたは ADP により誘導される血小板凝集を TNS ほどもには阻害しなかったが、DNS は、トロンビンにより誘導される GMP-140 発現を、強く阻害した。SPN および E-7 は、GMP-140 発現のいかなる阻害をも生じなかった。カルホスチン C は、10-20 μ M で、弱い阻害を示した [この化合物は、インビトロで、プロテインキナーゼ C を、0.05 μ M の濃度で阻害することが報告された (Tamaoki &

特表平6-504052 (13)

レインキュベートし、その後、トロンビンまたは ADP (ともに、Sigma から購入された) を添加した。血小板凝集は、分析用コンピューターが装備されている血小板凝集計 (Chrono-log Corp., Havertown, PA) を使用して、透過度変化により評価された。

TNS は、血小板凝集を阻害した。

実施例 2

GMP-140 の発現は、(i) Dr. Furie (Tufts 大学医学部, Boston, MA) から得た GMP-140 に特異的なモノクローナル抗体 (mAb) である AC1.2 によるフローサイトメトリー、および (ii) 血小板で被覆された固相上の EL60 細胞の接着、によって測定された。

タイロッド緩衝液中の血小板懸濁液 (1×10^8 / ml) を、阻害剤とともに、pH 7.2、37°C で 5 分間ブレインキュベートし、次にトロンビンまたはホルボール 12- ミリステート 13- アセテート (PMA) のいずれか (最終濃度 10^{-7} M) の活性化因子を補足し、混合物を 37°C で 10 分間、インキュベートした。血小板を、等量の PBS 中 2% (v/v) パラホルムアルデヒドで固定し、1% (v/v) BSA を含有する PBS で 2 回、洗浄した。

パラホルムアルデヒドで固定した血小板を 50 μ l mAb AC 1.2 (2.5 μ g/ml) とともに、室温で 30 分間、インキュベ

Nakano, Bio/Tech., 8, 732, 1990)。]。

同様の結果が、PMA で誘導される血小板についても得られ、例えば、TNS および DNS はともに、10-20 μ M で GMP-140 発現を強く阻害した (図 1 1 B)。E-7 は、15 μ M の濃度で PKC を阻害すると報告されているとしても (Tamaoki & Nakano, 上記)、SPN または E-7 のいずれも、阻害を示さなかった。

実施例 3

休止期の、または活性化された血小板で被覆された固相上の EL60 (ATCC より、受託番号 240 で入手可能なヒト前骨髄細胞系) の接着は、下記のように評価された。48 ウェルプレート (Costar Scientific, Cambridge, MA) の各ウェルを、ポリ-L- リシン溶液 (PBS 中 100 μ g/ml) で潤滑し、1 時間インキュベートした。次に、各ウェルを、PBS で洗浄し、その後、休止期の、または活性化された血小板 8×10^5 個を含有する PBS 150 μ l を、各ウェルに添加して、プレートを 1 時間インキュベートした。プレートを遠心分離 (300 × g、7 分間) し、さらに 30 分間室温でインキュベートした。結合した血小板を、PBS 中 0.1% (v/v) グルタルアルデヒドを、2 分間 4°C で添加することによって、固定した。各ウェルを、PBS 中 10 mM のグリシンで洗浄し、プレートを、PBS 中 0.1% (v/v) フリジ化ナトリウムおよび 10 mM

11 グリシンを含む5% (v/v) BSAとともに、室温で1時間インキュベートした。

培養培地 (5% (v/v) FCS を含む RPMI 1640) で洗浄した後、 $[^3\text{H}]$ チミジンで標識した 1×10^6 個の HL60 細胞を、各ウェルに添加した。HL60 を、10% FCS (Byclone, Logan, UT) を補足した RPMI 1640 培地 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA から購入) 中で維持した。(細胞接着アッセイのために使用される HL60 細胞の放射性標識化は、細胞を、 $2 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンと一晚インキュベートすることによって、行われた。) 室温で45分間インキュベーションした後、非結合細胞を吸引し、ウェルを培地 (5% (v/v) FCS を含む RPMI 1640) で1度洗浄し、結合細胞を、PBS 中 0.05% (v/v) トリプシン - 0.02% (v/v) EDTA (Irvine Scientific) により引き離し、各ウェル中の放射活性のレベルを、液体シンチレーションカウンターで測定した。

代表的実験からの結果を、図 12A および 12B に示す。トロンビンおよび PMA の両方で刺激した血小板について、HL60 細胞結合は、TMS および DNS によって強く阻害されたが、SPN によっては、最小にしか阻害されなかった。活性化血小板への HL60 細胞の結合は、HL60 細胞上に発現されるシアロシル- Le^x の GXP-140 による認識にのみ依存すると考えられる。それは、この結合が、シアロシル- Le^x

を含有するリボソームによって特異的に阻害されるが、他のグリコスフィンゴシンを含有するリボソームによっては阻害されないからである。

実施例 4

ヒト肝中球を、正常成人男子から得た。ヘパリン処理した末梢血を、60ml 注射器中で、等量の PBS 中 1% デキストラン溶液とともに穏やかに混合した。混合物を、60 から 90 分間 37°C で、垂直に立てておいた。上方の相は、白血球に富んでおり、Falcon 2095 プラスチック製試験管 (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) 中で、同じ体積の Ficoll-Paque (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) 上で、徐々にマウントした。450g で 30 分間、4°C で遠心分離することにより、試験管の底に肝中球がたまる。上方の相および界面は、リンパ球を含んでおり、これを吸引によって注意深く除去した。

混入赤血球は、細胞ペレットを氷冷蒸馏水中に 30 秒間再懸濁し、次に等しい量の氷冷した 1.8% NaCl 溶液を添加することにより、低張分解して、細胞ペレットから除去した。80g で 10 分間遠心分離した後、細胞を、適切な緩衝液または培地に再懸濁した。

最終調製物は、ライト・ギムザ染色によって測定されるが、98% より多くの肝中球から構成されていた。この懸濁

液を、4°C で貯蔵し、3 時間以内に使用した。

実施例 5

肝中球によるスーパーオキシド産生は、スーパーオキシド媒介によるチトクローム C の還元をモニターすることによって、定量された (Clifford, 上記、この中で還元は、550nm、吸光率 21000/M/cm で吸収の増加として明示される)。測定は、Beckman DU-50 分光光度計で 37°C で、1 ml 当たり約 1×10^6 個の肝中球を使用して、運行された。細胞を、 $1 \mu\text{M}$ PMA を添加する前に、10分間、TMS または他のエフェクターを用いて平衡化させた。

TMS は、肝中球のスーパーオキシド産生に対して、強い効果を有していた。

実施例 6

O₂ 消費は、Clark タイプの電極を用い、Y.S.I. モデル P300 生物学的酸素モニターおよびマイクロ酸素チャンバーアセンブリー (Y.S.I. Inc., Yellow Springs, OH) により、測定された。アッセイを、細胞液 800 μl 中 1 ml 当たり約 6×10^6 個の肝中球で、37°C で行った。細胞懸濁液は、マイクロチャンバーに適用する前に、エッペンドルフ試験管中で、37°C で数分間、温めた。エフェクターを、Bamilton 注射器を用いて注意深く注入し、マイクロスターラーを用いて約 240rpm の速度で充分に攪拌した。細胞懸濁液

は、PMA を最終濃度 $1.0 \mu\text{M}$ まで添加する前に、エフェクターとともに 5 分間ブレインキュベートした。

TMS は、肝中球の O₂ 消費に対して、顕著な効果を有していた。

実施例 7

新たに精製した肝中球 (約 8×10^7 細胞) を、脂質を含まない 0.1% BSA-HEPES (10mM pH 7.4, 136mM NaCl, 4.9mM KCl, 5.6mM グルコースおよび 0.33mM CaCl₂) を含む緩衝液中で、2mM の Na₂H³²P O₄ とともに、37°C で 60 分間、振とう水浴中で、ブレインキュベートした。過剰の非結合成分を、遠心分離により除去し、ペレットを、同じ緩衝液中に再懸濁し、2 度繰り返した。次に、細胞を、7 つの処理群に分けて、それぞれ細胞液 0.4 ml 中に約 1×10^7 個の細胞を含むようにした。TMS、SPN または DNS を、懸濁液に添加し、37°C で 10 分間インキュベートし、その後 PMA を、最終濃度 $1.5 \mu\text{M}$ まで添加した。2 分後、0.1 ml の Laemmli's 試料用緩衝液および 20mM EDTA を添加し、続いて 100°C で 5 分間加熱することによって、反応を停止させた。10% ドデシル硫酸ナトリウムゲルにより、アリコートをし、既知の手順で分離した。³²P の取り込みを、オートラジオグラフィによって、可視化した。

TMS は、プロテインキナーゼ C の代謝および活性に関連

する特定のタンパク質のリン酸化に対して、効果を有していた。

実施例 8

新たに精製したヒト肝中球 (0.1% BSA-HEPES 10mM 緩衝液: pH 7.45, 136mM NaCl, 4.9mM KCl, 5.6mM グルコースおよび 0.33mM CaCl_2 中に、 1.3×10^6 / ml) を、 4mM の $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ とともに、 37°C で 90 分間、瓶とう水浴中で、インキュベートした。インキュベーション後、細胞を洗浄し、同じ緩衝液中で、濃度 1×10^7 細胞/ml で、再懸濁した。次に各細胞液 (1ml) を、TES、SPN または DHS、あるいは等しい体積の 50% エタノールとともに、10 分間 37°C で前処理した。次に、同じ温度を維持しながら、 MnCl_2 を、最終濃度 1.0mM まで加えた。2 分後に、 3.75ml のクロロホルム/メタノール (1:2) を各細胞懸濁液に加え、続いて 15 分間超音波処理することによって、反応を停止させた。さらに 1.25ml のクロロホルム、 1.25ml の水、および $50\mu\text{l}$ のアセトンを加え、混合物全体を混合し、一夜放置した。

混合物を遠心分離した後、リン脂質を、フォルチ分配法 (Folch's partition method) により抽出し、細胞溶解液から、下相を取り出した。下相をエバポレートした後、 1% カリウムペルオキザレート (potassium peroxalate) (Sigma,

$0.20\mu\text{M}$ Nalgene フィルター (Nalgene Labware Division, Rochester, NY) を通した。

次に、カバースリップを、Kim-wipe ペーパータオルをその縁に触れさせることによって水気を取り、 100% エタノールに浸漬し、 85°C の熱風で乾燥させた。カバースリップを、 3.5cm の Falcon プラスチック製ディッシュに入れた。次に、 5.4ml の $\text{AuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ および 18ml の 36.5mM の Na_2CO_3 を、 33ml の蒸留水に添加し、加熱した。沸点に到達後、直ちに、 5.4ml の水中 0.1% ホルムアルデヒドを素早く添加し、混合した。褐色を形成する金の粒子の懸濁液を、ディッシュ (各 2ml) 上に直ちに分配し、カバースリップを、2 時間 37°C で、インキュベートした。

粒子で被覆されたカバースリップを、PBS 中、およびその後 RPMI 1640 中で 2 回洗浄し、最後に、 2ml の RPMI 1640 およびグルクメートおよびビルベートを含有する、もう 1 つの 3.5cm Falcon プラスチック製ディッシュに入れた。カバースリップを、 4°C で貯蔵し、調製後 24 時間以内に使用した。

新たに精製された肝中球 (1×10^6 細胞/プレート) を、コロイドで被覆したカバースリップ上に加えた。TES および他のエフェクターを、プレート上の培養中に添加した。対照料として、エフェクターの溶液 (50% エタノール) を、

St. Louis, MO) を含むメタノール/水 (2:3) を予め含浸した Whatman HP-KF (Whatman, Maidstone, England) のシリカゲル TLC プレート上で、約 10000cpm のリン酸化化合物を、マウントした。TLC プレートは、クロロホルム/メタノール/ 4M NaOH を 45:35:10 の比率で含み、 0.1% EDTA (トランス-1,2-ジアミノシクロヘキサン-N,N',N'-テトラ酢酸) を含有する溶液中で、対照時のリン脂質とともに、65 分間 37°C で展開した。ブリンリンを用いて対照時のリン脂質を染色し、紫外光下に可視化することにより、バンドを固定した。オートラジオグラフィは、Kodak 診断用フィルム CBX-2 (Rochester, NY) を用いて、一晩 37°C で露出することにより、行われた。

TES は、 P_4Mn に誘導されるホスファチジルイノシトールのリン酸化を抑制した。

実施例 9

食糸運動活性は、金のコロイド状粒子で覆われたガラス支持体上を動く肝中球の軌跡を追うことによって、観察された。この技術は、373 および他の細胞系を用いて、Albrecht-Buehler により、最初に記述された。簡単に述べると、 $22 \times 22\text{mm}$ 平方のガラス製カバースリップ (Corning Glass Works, Corning, NY) を、 1% BSA に、1 分間浸漬した。BSA 溶液は、各日ごとに新しく調製し、

等しい量で加えた。その濃度では (0.1%)、エタノールは、肝中球活性に対して、いかなる有意な効果ももたらさなかった。エフェクターに曝されたことからの細胞の回復を観察するために、肝中球 (2×10^5 細胞/ml) を、 $12\mu\text{M}$ の TES、SPN および DHS とともに 37°C でプレインキュベートし、次にエフェクターを 200 倍に希釈しながら、ディッシュドロップワイズ (dish dropwise) に分配した。インキュベーションを、 5% CO_2 下に、 37°C で 2 時間行い、 $200\mu\text{l}$ の 10% ホルムアルデヒドを添加することにより停止させた。各プレートの顕微鏡的検査は、Nikon 顕微鏡を、記録のために Polaroid カメラと接続して行った。食糸運動活性は、肝中球の軌跡をたどることによって測定した。この軌跡は、写真に記録され、次に、その通った領域を切り取り、重さを測ることにより、その面積を測定した。

TES は、細胞の生存度に対して悪影響なしに、肝中球の移動を阻害した。

実施例 10

HUVEC's および培養地を、Cell Systems (Kirkland, WA) から購入した。細胞を、いくつかの修正を加えて、Luscinskasら、上記に記載のように、維持し、培養した。簡単に述べると、HUVEC's を 10ml の組織培養プラスチック中で、ラット尾 (Upstate Biotechnology Inc, Lake Placid, NY)

から得たI型コラーゲン上で、CS- 完全培地、CS- 増殖因子およびCS-AF-1(Celi. Systems) とともに、維持した。細胞は、5% CO₂ 中で37℃でインキュベートしたとき、2〜4日以内にコンフルエント(confluent) になった。

移行(transmigration)アッセイのために、厚いゲルを、24ウェルの組織培養プレート中に形成した。ゲル溶液の調製は、4℃で行った。8重量部のコラーゲン溶液(Vitrogen 100、ウシの腱から得たもので、5mg/ml未凍のエンドトキシンを含んでいた; Celtrix Labs, Palo Alto, CA)、1重量部の10×RPNIおよび1重量部のアルカリ溶液(100 mlの0.05N NaOHおよび200mM HEPES 中に2.2gの NaHCO₃) を、緩やかに混合し、0.7 ml/ウェルに分配した。溶液を、4時間37℃で放置し、空気泡を取り除き、次に37℃オープン中で3時間、ゲル化させた。ウェルを、付着因子を有する1.0 mlのCS- 完全培地とともに少なくとも4回、および37℃ 5% CO₂ 中でさらにインキュベートする間は3〜6時間ごとに、洗浄した。

3未満の通過レベルで、BUVEC[®] s を、3 mlのトリプシン-EDTA を用いて、10mlの組織培養プラスコから、37℃で80〜80秒間、分離させた。直ちに、20% 熱不活化FCS を含むH199(3ml) を加えた。細胞を、遠心分離によって集めた。ペレットを、付着因子を有する10mlのCS- 完全培地に再懸

濁した。均一な細胞懸濁液を、各ウェルに0.7 mlずつプレートし、これらのプレートを8時間37℃でインキュベートした。上清は、死細胞を含んでおり、これを注意深く吸引して、付着因子を有する新しい完全培地を加えた。これらの条件下で、BUVEC[®] s は、コンフルエントな単層を形成し、その中で細胞内結合部は、プレートした後24時間以内に無染色を一樣に示し、細胞は、培養より1日後にその特色を維持していた。

24ウェル組織培養プレート中のBUVEC 単層を、FCS を含まないH199を用いて洗浄し、次に1 ml/ウェルのIL-1β (Boehringer Mannheim Biochemical Products, Indianapolis, IN) とともにインキュベートし、1%熱不活化FCS(BI FCS)を100/ml有するH199中に溶解した。プレートを、37℃、5% CO₂、4時間インキュベートし、次に1 mlのH199によって緩やかに洗浄した。1% H1FCSを含むH199中の精製した好中球懸濁液(1.5×10⁶ 細胞/ml) を、TBS または他のエフェクターとともに、10分間37℃で、ブレインキュベートした。ウェル中の培地を吸引した後、0.5 mlの好中球懸濁液を、BUVEC 単層上加えた。組織培養プレートを、90分間37℃で、インキュベートした。

細胞懸濁液を緩やかに吸引し、1 mlのPBS 中10% ホルムアルデヒドを添加することにより、培養を停止させ、固定

のために4℃で一晩、貯蔵した。コラーゲン床の縁は、ウェルから取り除く2時間前に、壁に沿って小さいスパチュラを用いて切り取った。コラーゲン床は、表面にBUVEC[®] s を有し、移行した好中球はパラフィン中に包埋されており、これを顕微鏡検査のために切片に作り、その後ヘマトキシリンエオジンで染色した。

TBS は、細胞の生存度に影響を与えることなしに、好中球の移動に対して影響を与えた。

本明細書中に引用されているすべての引例は、本明細書中に参考として、採用される。

本発明は、詳細に、および本発明の特定の実施態様を参考にして記載されているが、種々の変更および改変が、本発明の精神および範囲から逸脱することなく為され得ることは、当業者に明らかであろう。

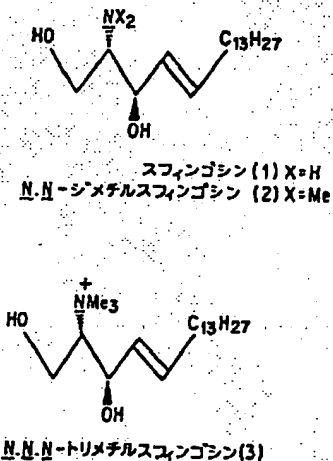


FIG. 1

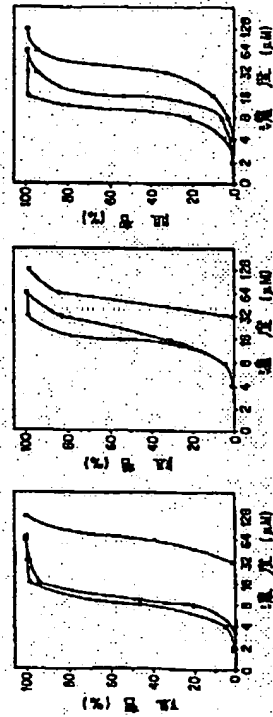


FIG. 2C

FIG. 2B

FIG. 2A

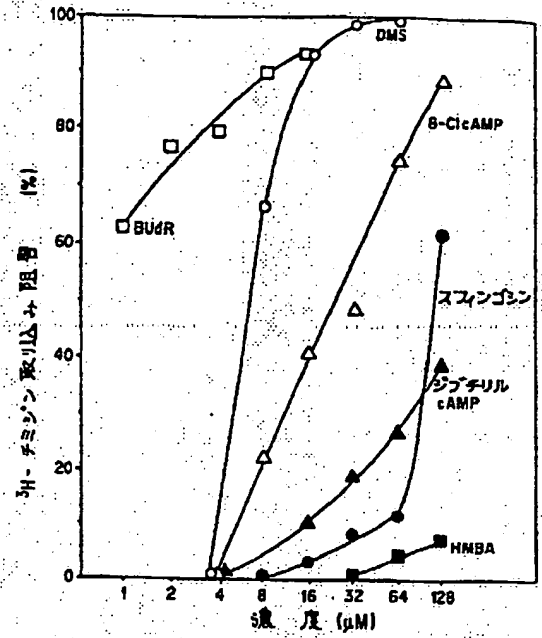


FIG. 3

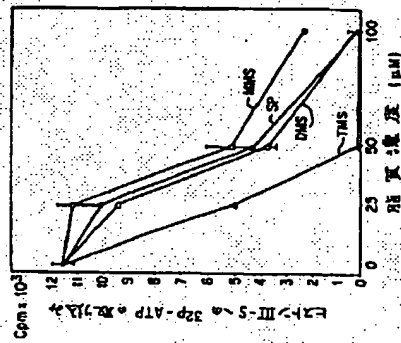


FIG. 4B

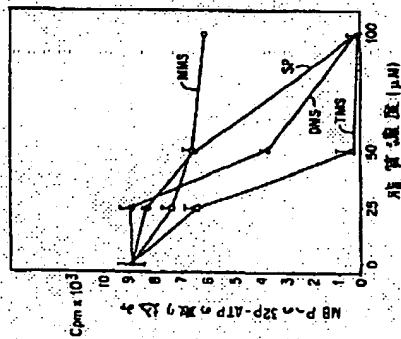


FIG. 4A

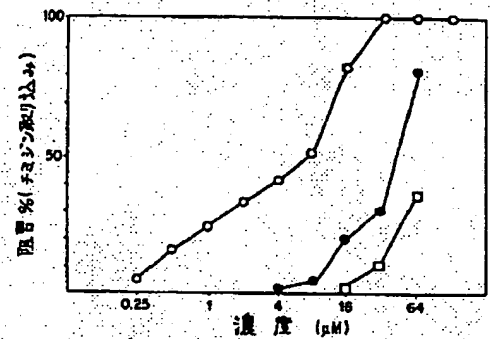


FIG. 5A

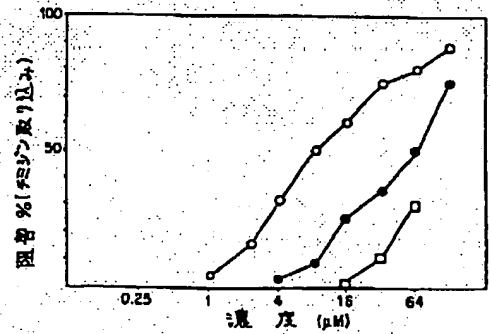
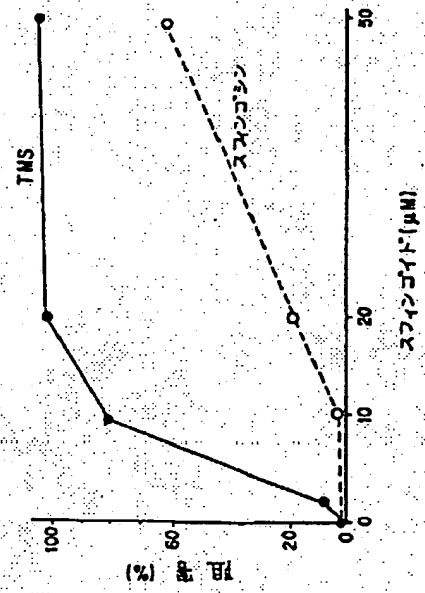
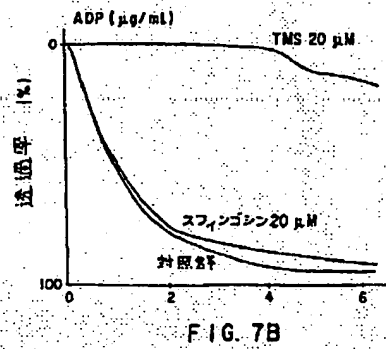
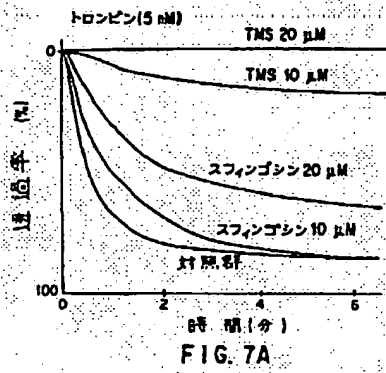
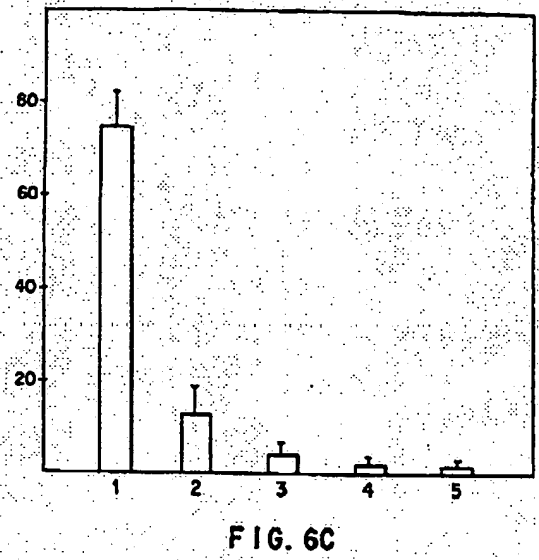
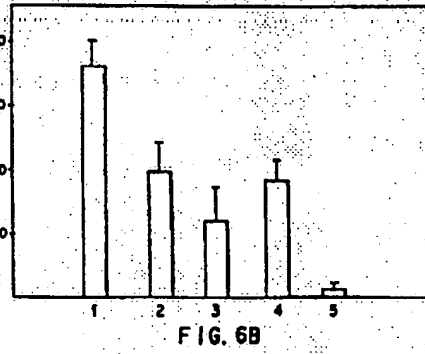
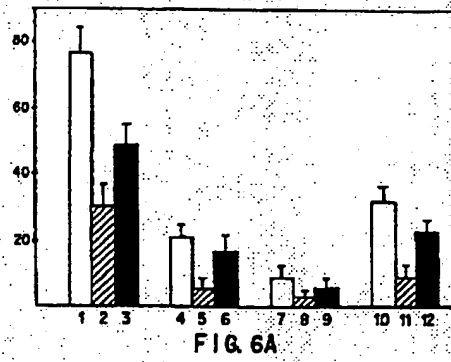


FIG. 5B



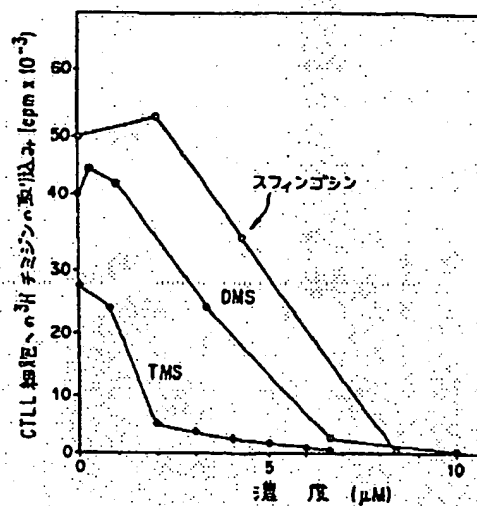
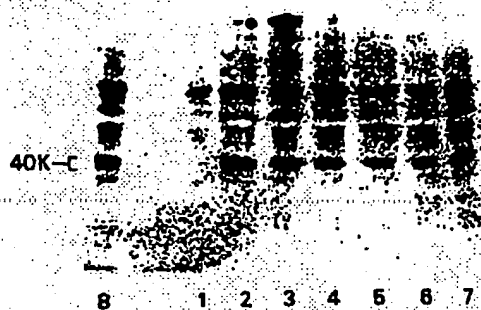


FIG. 10

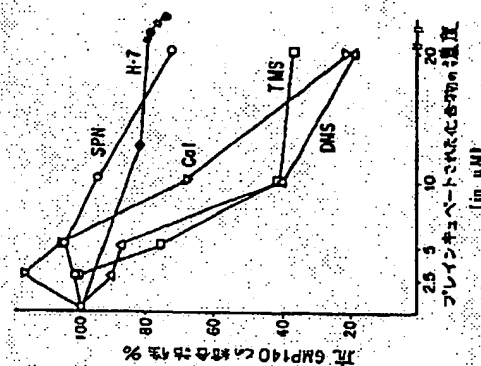


FIG. 11A

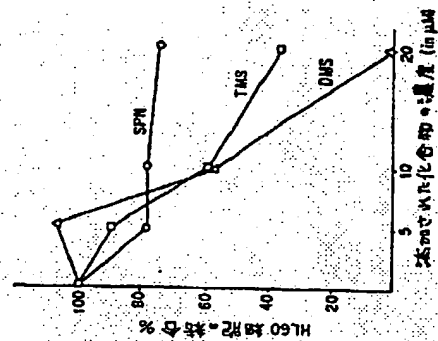


FIG. 12B

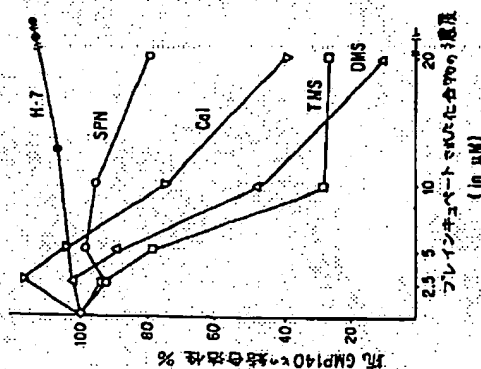


FIG. 11B

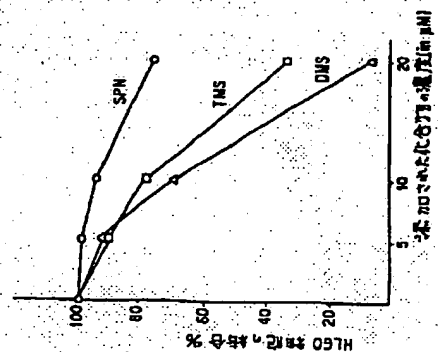


FIG. 12A

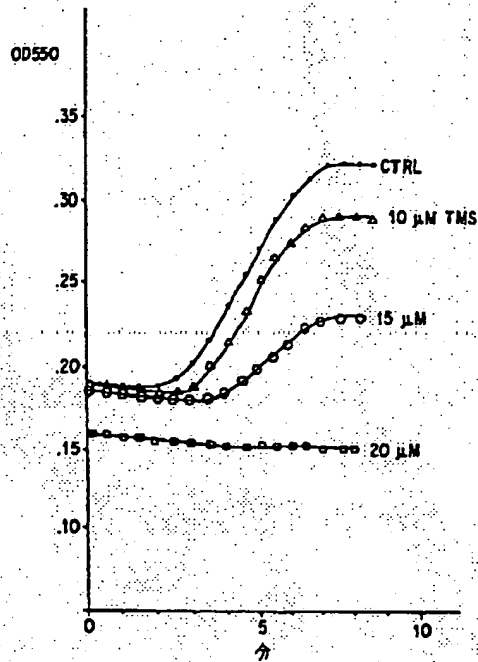


FIG. 13A

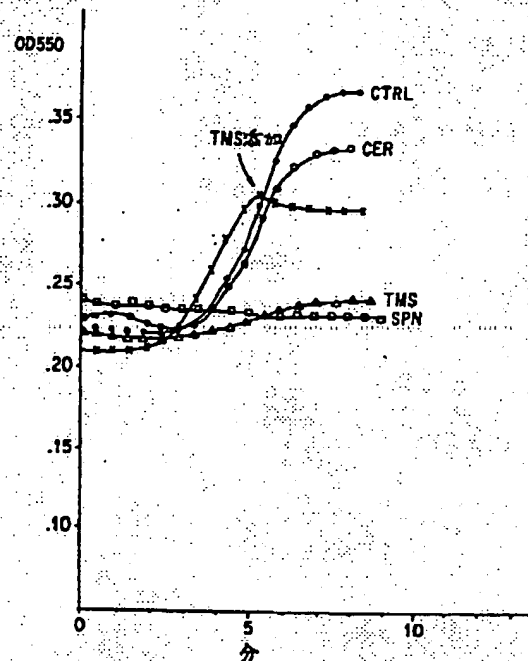


FIG. 13B

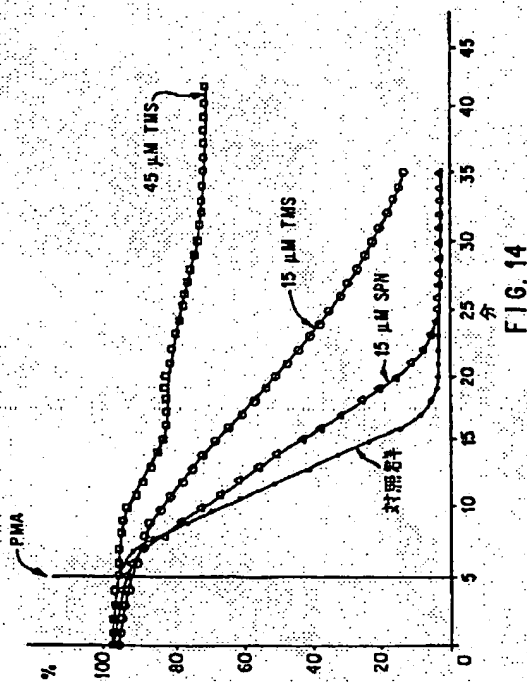


FIG. 14

[illegible]

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵ 識別記号 庁内整理番号 F. I.
A61K 31/13 AED

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), CA, JP, US

(72) 発明者 イガラシ ヤシュキ
アメリカ合衆国 98119 ワシントン シ
アトル エリオット アベニュー ウェスト
201 ザ バイオメンブレン インステ
イテュート内

(72) 発明者 ハコモリ センイチロウ
アメリカ合衆国 98119 ワシントン シ
アトル エリオット アベニュー ウェスト
201 ザ バイオメンブレン インステ
イテュート内

(72) 発明者 アーマド マハマッド・エヌ.
アメリカ合衆国 98119 ワシントン シ
アトル エリオット アベニュー ウェスト
201 ザ バイオメンブレン インステ
イテュート内

(72) 発明者 オコシ ヒロフミ
アメリカ合衆国 98119 ワシントン シ
アトル エリオット アベニュー ウェスト
201 ザ バイオメンブレン インステ
イテュート内

(72) 発明者 ハンダ カズコ
アメリカ合衆国 98119 ワシントン シ
アトル エリオット アベニュー ウェスト
201 ザ バイオメンブレン インステ
イテュート内